

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

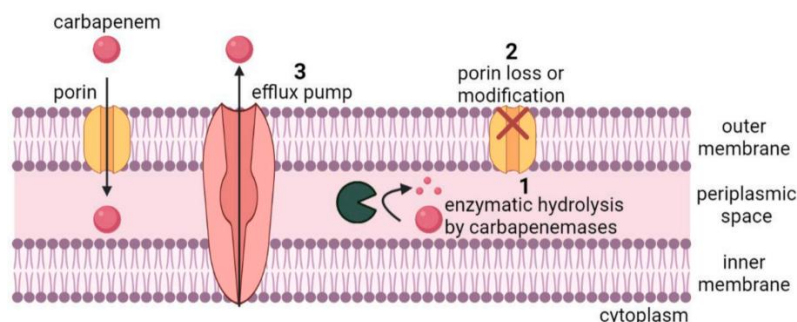
Ditemukannya dan penyebaran yang cepat dari bakteri Gram negatif resisten *carbapenem* (*Carbapenem-resistant Gram-negative Bacteria*/CR-GNB) merupakan ancaman kesehatan publik yang mendesak (CDC, 2021). CRE merupakan ancaman bagi kesehatan Masyarakat (ECDC, 2025). CRE dilaporkan telah meningkat sejak sepuluh tahun terakhir. Resistensi Meropenem pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* meningkat pesat dari 0,6% pada tahun 2004 menjadi 5,6% pada tahun 2008, menurut Program Pengumpulan Informasi Uji Kerentanan Tahunan *Meropenem* (Mengli, 2025).

Resistensi *carbapenem* pada Isolat *Escherichia coli* didapatkan 4,0% dan resistensi *carbapenem* pada isolat *K. pneumoniae* didapatkan hingga 10,8% terkait dengan infeksi berdasarkan National Healthcare Safety Network (NHSN) pada tahun 2006-2007 (WHO, 2024). Di Pakistan, bakteri resisten *carbapenem* telah ditemukan di beberapa rumah sakit, termasuk infeksi yang disebabkan oleh *Klebsiella pneumoniae* dan *Acinetobacter baumannii* (Paschal, et al 2022). Kemunculan dan peningkatan infeksi nosokomial dan komunitas yang resisten terhadap *carbapenem* memerlukan peningkatan pemantauan mikroorganisme yang resisten terhadap karbapenem dan infeksi terkait ((Sherris, 2009).

Pada penelitian di RS. Sardjito, Indonesia, prevalensi bakteri resisten *carbapenem* tertinggi ditemukan 46,43%-70% *carbapenem* resisten *Acinetobacter baumannii*, diikuti *Pseudomonas aeruginosa* dengan prevalensi 12,82%-23,33%, dan *carbapenem* resisten *Enterobacterales* dengan prevalensi 0,73%-8,24%. (Primasari et al., 2022). Studi *carbapenem non susceptible Pseudomonas aeruginosa* (CNPA) di RS. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, melaporkan 17/412 (4,1%) pasien membawa CNPA pada saat masuk ICU dan 34/395 (8,6%) menjadi positif selama masa inap di ICU, terdapat pula 12 (75,0%) CNPA dari 16 isolat lingkungan. (Saharman et al., 2019) gen OXA51 pada 50 isolat *A. baumannii*, paling banyak dari sampel sputum (60%). (Zuchrullah & Nurdin, 2024).

Sementara bakteri penghasil *carbapenemase* umumnya dikaitkan dengan rumah sakit dan fasilitas perawatan jangka panjang, ditemukannya resistensi *carbapenem* di fasilitas perawatan primer baru-baru ini mendapat perhatian (Rabaan, et al 2022). Sistem perawatan lini primer, seperti klinik dan fasilitas rawat jalan, yang menyediakan layanan perawatan kesehatan, seringkali menjadi titik kontak pertama bagi pasien yang membutuhkan penanganan medis.

Mekanisme utama resistensi ini adalah produksi enzim *carbapenemase*, yang menghidrolisis *carbapenem*, dan membuat antibiotik tidak efektif. (Aurilio et al., 2022; Armstrong et al., 2021). Organisasi kesehatan, seperti *the Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dan *the World Health Organization* (WHO), telah mengidentifikasi *Carbapenemase Resistant Enterobacteriaceae* (CRE) yang sebagai salah satu ancaman paling kritis yang terkait dengan masalah resistensi antibiotik yang berkembang. (Tsukada et al., 2024)



Gambar.1.1 Mekanisme Resistensi antibiotik (Breanna dixon et al, 2022)

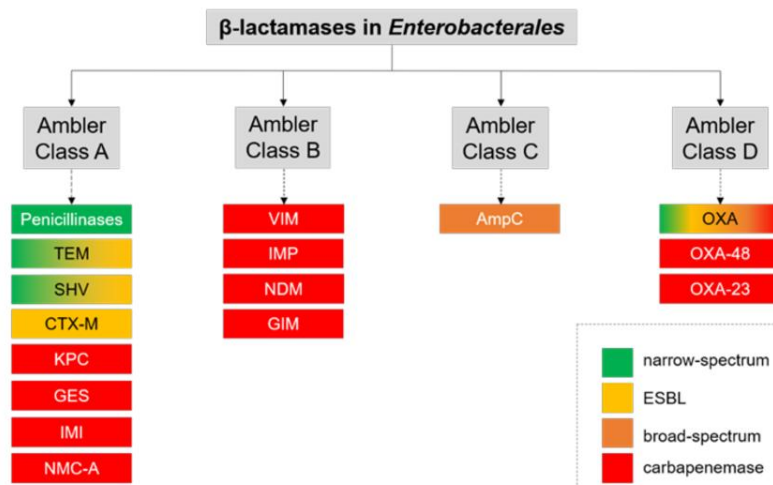
Mekanisme umum dari resistensi termasuk dalam empat kategori besar. Mekanisme resistensi antibiotik *carbapenem* dengan memodifikasi enzimatis yaitu menghasilkan enzim *carbapenemase*. Resistensi terhadap *carbapenem* dapat dikaitkan dengan tiga mekanisme utama lain: resistensi yang diperantarai oleh porin untuk mengurangi penyerapan *carbapenem*, pompa *efflux*, yang memompa *carbapenem* di luar sel dan resistensi oleh enzim yang dimediasi melalui akuisisi gen *carbapenemase*. Penurunan penyerapan atau peningkatan *efflux* antibiotik biasanya dikaitkan dengan ekspresi berlebih dari β -laktamase yang memiliki afinitas lemah untuk *carbapenem* seperti pada gambar 1.1 (Baylay et al., 2020; Elshamy & Aboshanab, 2020; Vrancianu et al., 2021).

Klasifikasi Ambler didasarkan pada struktur molekul dan mekanisme kerja enzim β -laktamase, dan terbagi menjadi empat kelas (A, B, C, D). Namun, hanya kelas A, B, dan D yang mencakup enzim *carbapenemase* (Lawrence et al, 2024). Kelas A – Serin β -laktamase. Mengandung residu serin pada situs aktif untuk memutus cincin β -laktam. Contoh utama: KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Dapat dihambat oleh inhibitor β -laktamase seperti avibactam. Gen biasanya berada di plasmid dan mudah ditransfer antar bakteri. Bakteri: *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, dll (Grayson, 2020).

Kelas B – Metallo- β -laktamase (MBL). Mengandung ion seng (Zn^{2+}) di situs aktif. Tidak menggunakan serin, melainkan logam untuk hidrolisis. Contoh utama: NDM (New Delhi Metallo- β -laktamase), VIM (Verona Integron-encoded Metallo- β -laktamase), IMP (Imipenemase). Tidak bisa dihambat oleh inhibitor β -laktamase biasa, tapi bisa dihambat oleh EDTA (karena mengikat ion Zn^{2+}). Sangat berbahaya karena resisten terhadap banyak antibiotik. Gen berada di plasmid dan mudah menyebar (Grayson, 2020).

Kelas D – OXA-type β -laktamase. Disebut juga oxacillinase karena awalnya menghidrolisis oxacillin. Beberapa variannya bisa menghidrolisis karbapenem. Contoh utama: OXA-48, OXA-23, OXA-58. Umumnya ditemukan pada: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*. Tidak efektif dihambat oleh inhibitor β -laktamase standar (Grayson, 2020).

Enzim *carbapenemase* yang paling umum ditemukan adalah *Imipenemase (IMP)*, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)*, dan *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM)*, New Delhi metallo- β -lactamase (*NDM*) yang dapat berpindah melalui plasmid (Aglave et al, 2025). Perpindahan *plasmid* secara horisontal menyebarkan mekanisme resistensi pada bakteri lain, dan memahami ekologi *plasmid* pada lingkungan rumah sakit dapat membantu dalam merancang strategi pengendalian untuk mencegah infeksi nosokomial. (Josefina et al., 2024)



Gambar 1.2 Klasifikasi Betalactamase menurut Ambler

Sumber : (Noster, , et.al, 2021)

Organisme penghasil *carbapenemase* umumnya ditemukan di sejumlah negara di dunia. Bakteri ini tidak selalu menyebabkan infeksi, tetapi sering berada di usus orang yang telah menjadi pembawa bakteri dengan perubahan genetik ini. Infeksi kemungkinan besar didapat melalui paparan perawatan kesehatan di daerah-daerah di mana bakteri ini biasa ditemukan. Ini termasuk negara-negara di mana CPO telah diidentifikasi di fasilitas perawatan kesehatan mereka.

Enterobacteriaceae yang umum (keluarga bakteri yang meliputi *E. coli*, *Serratia*, *Klebsiella* dan *Enterobacter*) ditemukan dalam usus manusia normal. Ketika anggota keluarga ini memiliki menjadi resisten terhadap karbapenem dengan memproduksi karbapenemase, mereka disebut *enterobacteriaceae* resisten karbapenem (CRE) atau penghasil karbapenemase *enterobacteriaceae* (CPE). CPO termasuk kelompok bakteri yang lebih besar, di luar keluarga *enterobacteriaceae*.

Kadang-kadang bakteri ini dapat menyebar ke luar usus dan menyebabkan infeksi serius, seperti infeksi saluran kemih, infeksi aliran darah, infeksi luka, dan pneumonia. Ketika ini terjadi bakteri usus normal memperoleh karakteristik CPO dan menyebar ke luar usus, mereka bisa sangat sulit untuk diobati. Pasien dapat menjadi rentan terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang kebal terhadap antibiotik.

Menurut Kyunhim dan kawan kawan (2022), terdapat 32 jenis organisme yang resisten terhadap karbapenem yang ditemukan di lingkungan saluran air di rumah. Saluran air, limbah, dan keran adalah area yang paling sering terkolonisasi, dengan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai organisme yang paling sering diidentifikasi (Gholipur et al, 2024). Banyak penelitian menunjukkan bahwa limbah merupakan sumber utama

organisme penghasil carbapenemase, seperti Enterobacteriaceae penghasil carbapenem (CPE), Acinetobacter baumannii resisten carbapenem (CRAB), dan Pseudomonas aeruginosa resisten carbapenem (CRPA), yang ditularkan kepada pasien (Kyunhim et al, 2022; Gholipur et al, 2024; Mohammed, 2021).

Salah satu reservoir potensial untuk *carbapenemase* resisten di fasilitas perawatan primer adalah *sink/wastafel* (Kyunhim et al, 2022). Wastafel sering digunakan untuk kebersihan tangan dan dapat menampung mikroorganisme, termasuk bakteri yang resisten terhadap obat, dikarenakan tindakan pembersihan dan disinfeksi yang tidak tepat. Salah satunya perlu diperhatikan kebersihan pada tempat wastafel yang biasanya digunakan oleh tenaga kesehatan untuk mencuci tangan sewaktu setelah melakukan tindakan medis. Di ruang ICU rumah sakit Brussels, Belgia, didapatkan 7 dari 8 wastafel ditemukan kontaminasi *Carbapenemase-Resistant Enterobacter*. Kramer dan rekan menjelaskan bahwa wastafel dapat menjadi reservoir tersembunyi yang menghasilkan aerosol dalam jumlah besar (Kyunhim et al, 2022).

Semakin banyak orang tahu bahwa saluran pembuangan wastafel adalah salah satu reservoir lingkungan yang mungkin ada di lingkungan perawatan pasien. Ini adalah reservoir yang dapat digunakan untuk pasien rawat inap yang tahan terhadap berbagai patogen yang terkait dengan perawatan kesehatan. Menurut Kyunhim et al, 2022, sebuah penelitian menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat menyebar melalui tetesan besar yang dihasilkan selama penggunaan keran, serta permukaan saluran pembuangan dan mangkuk wastafel yang terkontaminasi (Gholipur et al, 2024).

Permukaan di sekitar mangkuk wastafel dapat tercemar oleh organisme yang tetap hidup yang terkait dengan tetesan ini (Gholipur et al, 2024). Karena morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh bakteri gram negatif yang resisten, organisme yang menghasilkan carbapenemase (CPO) telah menarik perhatian dunia (Regev-Yochay et al., 2024). Strain bakteri yang tahan terhadap Carbapenemase Enterobacteriaceae diuji untuk kesamaan genetik dalam 132 kasus di rumah sakit Israel. Pada 36,4% kasus ini, pola yang sama ditemukan pada spesies bakteri yang berbeda dengan berbagai gen resistensi (Regev-Yochay et al., 2024). Kontaminasi wastafel sering dilaporkan sebelum pasien dirawat di rumah sakit, menunjukkan bagaimana wastafel sampai ke pasien (Regev-Yochay et al., 2024).

Meskipun data terbatas untuk beberapa wilayah, penyakit yang disebabkan oleh patogen resisten *carbapenem* serupa di sebagian besar wilayah (yaitu, Asia-Pasifik, benua India, Eropa, Amerika Utara, dan Amerika Latin), dengan bakteri non fermenter menjadi patogen yang paling sering ditemukan, diikuti oleh proporsi CRE yang relatif lebih rendah. Data dari survey studi besar dan investigasi rumah sakit yang lebih kecil menunjukkan kesamaan tingkat resistensi *carbapenem* terlepas dari metodologi yang digunakan untuk mendeteksi mekanisme resistensi atau antibiotik yang digunakan (Noordman, et al 2019). Dalam penelitian yang berbasis di AS dari Premier Healthcare Database, yang mengumpulkan data tentang infeksi yang didapat dari rumah sakit dan masyarakat, 44,8% dari *A. baumannii* dan 14,2% dari isolat *P. aeruginosa* yang resisten terhadap *carbapenem*, dibandingkan dengan hanya 1% dari *Enterobacteriaceae* (Gholipur et al, 2024).

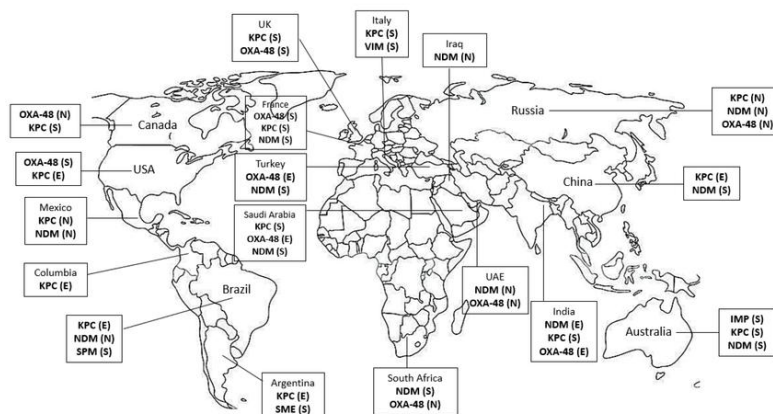
Berbeda dengan Amerika Utara dan Eropa, NDM dan MBL (misalnya, IMP, VIM), dan tipe OXA-48, daripada KPC, adalah *carbapenemase* yang paling banyak ditemukan pada CRE di Asia Tenggara (Suwantararat, et al, 2016). Sebuah studi tahun 2013-2016 terhadap 130 isolat yang resisten terhadap *carbapenem* di Filipina mengidentifikasi 45 (35%) isolat bakteri penghasil *carbapenemase* dengan 43 (33%) dinyatakan positif NDM dan 2 (1,5%) untuk VIM, yang mana keduanya ditemukan pada *P. Aeruginosa* (Velasco,

et al 2016). Laporan surveilans di India dan negara-negara sekitarnya mengungkapkan bahwa enzim *carbapenemase* yang paling sering ditemukan adalah NDM pada *Enterobacteriaceae* dan OXA-23 pada *A. Baumannii* (Hsu,et.al 2017).

Dalam penelitian prospektif multinasional European Survey on *Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae* (EuSCAPE), didapatkan 37% *K. pneumoniae* yang tidak resisten terhadap *carbapenem* dan 19% *E. coli* yang tidak resisten terhadap *carbapenem*, dan dikonfirmasi memiliki gen *carbapenemase*, dengan yang mengkodekan *carbapenemase* KPC (42%) dan OXA-48 (38%) paling sering ditemukan (Alvisi et. Al, 2025).

Kasus pertama *K. pneumoniae* yang mengekspresikan IMP-1 dilaporkan di Brasil pada tahun 2005. Di sebuah rumah sakit di Meksiko, peningkatan resistensi *carbapenem* yang signifikan ditemukan antara tahun 2011 dan 2015, dan 96% *K. pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem mengekspresikan KPC (Alvisi et. Al, 2025). Dalam sebuah penelitian oleh López-García, deteksi enzim IMP dan GES dilaporkan pada *P. aeruginosa* yang resisten terhadap *carbapenem*; Namun, beberapa strain memiliki beberapa mekanisme yang hadir secara bersamaan, seperti MBL dan hilangnya ekspresi porin, yang menghasilkan konsentrasi penghambatan minimum meropenem yang sangat tinggi (Alvisi et. Al, 2025).

Namun terdapat keterbatasan data epidemiologi wastafel yang terkontaminasi *carbapenemase* di Indonesia terutama di kota Makassar.



Gambar 1.3 Epidemiologi gen penyandi *Carbapenemase*.

Sumber : Hammoudi, 2020)

Untuk menyaring gen resistensi seluler yang paling penting secara klinis, aksesibilitas teknik diagnostik cepat tidak hanya memungkinkan pengawasan infeksi multi-resisten ini tetapi juga memungkinkan identifikasi wabah lebih awal dan, oleh karena itu, dapat memfasilitasi penyebaran bakteri resisten. Dengan demikian, teknik molekuler juga diperlukan untuk deteksi gen karbapenemase yang cepat, akurat, dan sensitif. Karena keterbatasan tes konfirmasi karbapenemase fenotipik, metode standar emas untuk mendeteksi karbapenemase didasarkan pada teknik molekuler, terutama PCR, seperti PCR konvensional dengan pengurutan, PCR multiplex dan hibridisasi DNA. hibridisasi DNA, dan lainnya juga diterapkan untuk mendeteksi gen karbapenemase. Teknik-teknik ini relatif kompleks dan membutuhkan peralatan yang mahal. Multiplex Analisis PCR dan tes microarray DNA adalah yang paling teknik molekuler yang paling spesifik yang telah dikembangkan. Pendekatan berbasis PCR dan sekuensing cocok untuk deteksi gen resistensi bahkan dari bahan primer, meskipun ada yang lebih mahal, tetapi merupakan cara pengujian yang paling sering diterapkan.

Pengurutan gen, sebagian besar untuk tujuan epidemiologi dan penelitian penelitian, sangat menarik untuk dilakukan.

Detection methods	Advantages	Limitations
Phenotypic detection assays		
Modified Hodge test (MHT)	1. Detecting KPC 2. Simple and inexpensive	1. False-positive and false-negative 2. Insufficient for MBLs 3. Time consuming
Colorimetric assay	1. Detecting KPC and most MBLs 2. Type carbapenemases 3. Simple and inexpensive	1. Insufficient for OXA-48 2. Specific reagents 3. Various infecting factors
Modified carbapenem inactivation method (mCIM)	1. Detecting all carbapenemases 2. Clear criteria of judgment 3. Simple and cost-effectiveness	1. Time consuming
Spectrophotometric method	1. High sensitivity and specificity 2. Time saving 3. Simple and inexpensive	1. Specific instrument (spectrophotometer) 2. Various influencing factors 3. No standard equation and cut-off value 4. Small sample size
MALDI-TOF-based methods	1. Detecting KPC and NDM 2. Time saving 3. Easy to perform 4. Low measurement cost	1. Insufficient for OXA-48 2. No clear protocol and standard analysis 3. Expensive equipment
Molecular-based detection methods	1. Gold standards 2. Detecting all carbapenemases genes 3. Type carbapenemase genes 4. Time saving	1. High technical requirements 2. Insufficient for expression of genes 3. High measurement cost

Tabel. Metode tes gen carbapenemase. Sumber : (Cui et al., 2020)

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi pentingnya mengetahui apakah terdapat bakteri penghasil *carbapenemase* pada sink di fasilitas perawatan primer. Menyoroti potensi risiko yang ditimbulkannya bagi pasien dan penyedia layanan kesehatan, kami akan melihat faktor-faktor yang berkontribusi terhadap keberadaan organisme penghasil *carbapenemase* di *sink*/wastafel, tantangan yang terkait dengan deteksinya, dan implikasinya untuk tindakan pengendalian infeksi.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian dengan beberapa rumusan masalah sebagai berikut: Seiring terjadinya peningkatan pasien yang didapatkan mengalami resistensi antibiotik *Carbapenemase*, dan belum ada penelitian yang meneliti hal ini khususnya di Wilayah kota Makassar. Oleh karena itu kami akan meneliti, Survei Multisenter Molekular Bakteri Penghasil *Carbapenemase* pada Wastafel di Beberapa Puskesmas di wilayah Kota Makassar

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah: “Apakah dapat terdeteksi gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif-Gram pada wastafel di puskesmas daerah kota Makassar? “

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pola gen resistensi karbapenemase pada wastafel di layanan Puskesmas wilayah Kota Makassar

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Diketuainya profil gen *carbapenemase* pada wastafel di puskesmas wilayah Kota Makassar.
2. Diketahui profil wastafel yang mengandung *carbapenemase* pada puskesmas di wilayah Kota Makassar.
3. Identifikasi molekular bakteri penghasil *carbapenemase* pada puskesmas di wilayah Kota Makassar.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang bakteri penghasil *Carbapenemase* di wilayah Kota Makassar

1.4.2 Manfaat Untuk Instansi Kesehatan

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bukti ilmiah dalam penentuan kebijakan Dinas Kesehatan Kota Makassar tentang perlunya higienisitas wastafel yang terdapat di Puskesmas untuk mengurangi kemungkinan penyebaran gen *carbapenemase*.

1.4.3 Manfaat Untuk Peneliti

Bagi peneliti, dapat menambah pengetahuan mengenai gen *carbapenem* apa saja yang menghasilkan karbapenemase yang ditemukan pada wastafel di fasilitas puskesmas di wilayah Kota Makassar. Bagi peneliti selanjutnya, penelitian ini dapat menjadi acuan sumber informasi untuk meneliti lebih lanjut terkait penelitian saat ini berbasis lingkungan dengan meneliti pasien yang terdapat di fasilitas layanan primer yang mengalami masalah resisten *carbapenemase*.

1.5 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian ini adalah penelitian genetik tentang gen penyandi *carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram di semua Puskesmas di kota Makassar.

1.6 Kebaruan Penelitian

Penelitian tentang adanya gen penyandi *carbapenemase* yang dihasilkan bakteri negatif Gram dari wastafel rumah sakit umum di Indonesia khususnya di kota Makassar belum ada. Oleh karena itu penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data terkait gen *carbapenemase* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dari wastafel Puskesmas di kota Makassar

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observatif dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan mengetahui adanya gen penyandi *carbapenemase* yang diproduksi bakteri negatif Gram pada spesimen *swab* wastafel semua Puskesmas di wilayah kota Makassar.

2.2 Waktu dan Tempat

2.2.1 Waktu Penelitian

Pengambilan sampel *swab* pada wastafel di semua puskesmas di wilayah kota Makassar dan identifikasi molekuler dilakukan dalam kurun waktu September 2024 - Desember 2024.

2.2.2 Tempat Penelitian

1. Pengambilan sampel *swab* pada wastafel semua Puskesmas di wilayah kota Makassar
2. Identifikasi molekuler gen *carbapenemase* spesimen *swab* wastafel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2.3 Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 2.1 Alat Penelitian

No	Nama Alat	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Mesin PCR	Biorad	1 buah
2	Gel DOC		1 buah
3	Mesin Elektroforesis		1 buah
4	<i>Sentrifuge</i>		1 buah
5	<i>Waterbath</i>		1 buah
6	<i>Laminal Flow</i>		1 buah
7	BSC Tipe II		1 buah
8	Mikropipet (1000 ul, 100ul, 20ul, 10ul)		1 pcs
9	Cetakan Agarosa		
10	Tips(1000ul,100ul,20ul,10ul)	<i>Universal fit bulk packed pipet tips,yellow,nonsterile.</i> Corning	1000 pcs
11	Tabung eppendorf / microtube 1,5 ml	500 pcs/box.Brand	1 box
12	<i>Erlenmeyer</i> ,Gelas Ukur		
13	PCR Tubes	Vol 0,2 ml, <i>non-sterile,clear</i> ,960 pcs per box, Corning	1 box

No	Nama Bahan	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Swab Amies Agar Gel	PK-TS0001A, Copan, Citoswab	150 buah
2	MacConkey Agar 500 gram	Liofilchem-L-610028	1 botol
3	Petri dish 3 vent 90x15 mm	Thermo; 101VR20	1 box
4	DNA Extraction Kit	gSYNC™ DNA extraction kit, 300 prep/kit	1 kit
5	Primer IMP-F Primer IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC (blaIMP 232 bp) GGTTTAAYAAAACAACCACC	1 set
6	Primer VIM-F Primer VIM-R	GATGGTGTGGTTCGCATA (blaVIM 390 bp) CGAATGCGCAGCACCAG	1 set
7	Primer OXA-F Primer OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC (blaOXA 438 bp) CATCAAGTTCAACCCAACCG	1 set
8	Primer KPC-Fm Primer KPC-Rm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG (blaKPC 798 bp) CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	1 set
9	Primer NDM-F Primer NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC (blaNDM 621 bp) CGGAATGGCTCATCACGATC	1 set
10	Primer UidA Bakteri <i>Escherichia coli</i>	For: GTCACGCCGTATGTTATTG (621 bp) Rev: CCAAAGCCAGTAAAGTAGAAC	1 set
11	Primer 16s DNA Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	For: ATGTCTGGGAAACTGCCTGATG (372 bp) Rev: CGGGTAACGTCAATAGACAAGG	1 set
12	Primer GyrA Bakteri <i>Klebsiella sp</i>	For: CGCGTACTATACGCCATGAACGTA (441 bp) Rev: ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	1 set
13	Primer RpoB Bakteri <i>Klebsiella pneumonia</i>	For: CAACGGTGTGGTTACTGACG (108bp) Rev: TCTACGAAGTGGCCGTTTTTC	1 set
14	Primer PA – SS Bakteri <i>P. Aeruginosa</i>	PA-SS-F GGGGGATCTTCGGACCTCA (956 bp) PA-SS-R TCCTTAGAGTGCCCAACCG	1 set

15	Enzim PCR	<i>Go Taq Green MasterMix</i> 100 rxns	3 set
16	RNAse Free water		
17	Agarosa	2120CN, 100 gram	1 pc
18	<i>Ethidium Bromida</i>		
19	TBE 0,5		
20	<i>Loading Dye</i>		
21	DNA Leader / Marker (100 bp)	VC 100 BP Plus DNA Ladder, Vivantis	1 pack

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah semua Puskesmas yang berlokasi di wilayah kota Makassar periode September 2024 – Desember 2024

2.3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah spesimen *swab* dari wastafel di ruang IGD, atau ruang tindakan di seluruh Puskesmas yang berlokasi di wilayah kota Makassar periode September 2024 - Desember 2024 yang memenuhi kriteria subyek penelitian

2.4 Kriteria Subyek Penelitian

2.4.1 Kriteria Inklusi

1. Wastafel di ruang IGD, atau ruang tindakan
2. Semua wastafel yang berfungsi dengan baik

2.4.2 Kriteria Eksklusi

1. Wastafel yang tidak mempunyai fasilitas air mengalir
2. Wastafel yang tidak pernah digunakan
3. Wastafel yang digunakan membuang sampah

2.5 Jumlah Subyek Penelitian

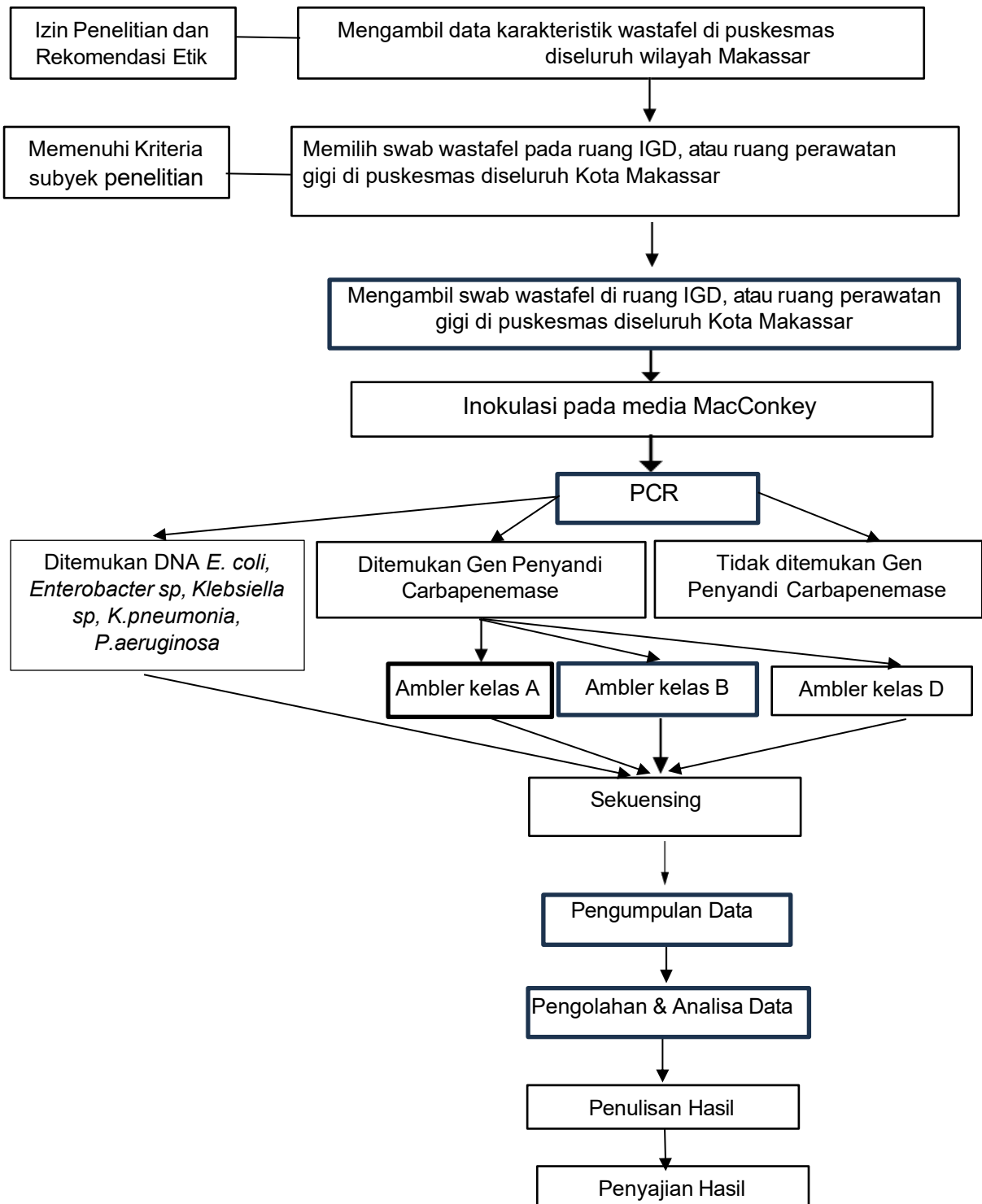
$$n = N$$

N = Jumlah populasi (sesuai dengan jumlah wastafel yang memenuhi kriteria inklusi yang terdapat di puskesmas diseluruh wilayah kota Makassar)

n = jumlah sampel

2.6 Pelaksanaan Penelitian

2.6.1 Alur Penelitian



2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Pemeriksaan Kultur

Sampel swab wastafel diambil untuk dikultur pada media *MacConkey Agar* dengan prosedur pemeriksaan mengikuti prosedur operasional standar Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar.

Swab Amies digunakan untuk mengumpulkan sampel dari saluran pembuangan wastafel. Swab dimasukkan ke dalam saluran pembuangan (inlet) wastafel sedalam 5-10 cm, kemudian diputar pada sisi dinding pipa wastafel, minimal 3 kali hingga setengah dari lingkaran pipa pembuangan telah diambil sampelnya. Sampel yang terkumpul dimasukkan dalam tabung dengan medium transpor Amies dan dibawa dalam kotak sampel dengan icepack ke laboratorium.

Swab wastafel diproses ≤ 24 jam setelah sampel dikumpulkan. Swab diinokulasikan pada plate agar *Macconkey* dengan streaking 4 kuadran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Keesokan harinya, plate tersebut diperiksa untuk mengetahui adanya pertumbuhan koloni bakteri fermentor laktosa atau non fermentor laktosa. Jika terdapat lebih dari 1 koloni, dilakukan subkultur ke media *MacConkey Agar*.

2.7.2 Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Setiap koloni bakteri yang tumbuh pada media *MacConkey* diperiksa menggunakan metode PCR untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif dan mendeteksi keberadaan gen penyandi carbapenemase.

2.7.2.1. Ekstraksi DNA

Persiapan Sampel: Suspensi bakteri (standar McFarland 0,5–1) dibuat dalam tabung ependorf, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 300 x g. Supernatan dibuang, ditambahkan 200 μ l PBS dan 20 μ l campuran Proteinase K. Kemudian dilakukan melisis sel dengan cara tambahkan 200 μ l GSB Buffer, vortex, lalu inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit, dengan vortex tiap 5 menit. Dilakukan pengikatan DNA dengan tambahkan 200 μ l etanol, vortex selama 10 detik, dan masukkan ke dalam GS Column, lalu sentrifugasi pada 14.000–16.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan cara tambahkan 400 μ l W1 Buffer, sentrifugasi selama 30 detik. Tambahkan 600 μ l Wash Buffer, sentrifugasi lagi, ganti tabung koleksi, dan sentrifugasi akhir selama 3 menit. Terakhir dilakukan elusi DNA dengan cara GS Column dipindahkan ke tabung ependorf steril, tambahkan 100 μ l Elution Buffer yang telah dipanaskan, sentrifugasi 30 detik. Hasil elusi adalah DNA yang siap untuk PCR.

2.7.2.2. Pembuatan Campuran PCR (PCR Mix)

Tiap PCR mix mengandung Go Taq Master Mix, primer spesifik (IMP, VIM, NDM, OXA, KPC, UidA, AtpD, 16sDNA, gyrA, RpoB, PA-SS), Nuclease-Free Water, dan DNA sampel, dengan total volume 50 μ l.

2.7.2.3. Proses PCR

Proses awal PCR melalui Pra-denaturasi dengan suhu 94°C selama 10 menit (1 siklus). Dilanjutkan 3 siklus Amplifikasi (30 siklus), yaitu denaturasi dengan suhu 94°C selama 20 detik, kemudian annealing dengan suhu 52°C selama 40 detik, dan ekstensi dengan suhu 72°C selama 30 detik. Proses terakhir saat PCR adalah ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 5 menit.

2.7.2.4. Elektroforesis Gel

Proses elektroforesis gel dilakukan pertama kali dengan pembuatan gel dengan bahan 2 gr agarose dalam 100 ml TBE Buffer 0,5x, dipanaskan, didinginkan, dan

ditambahkan 5 μ l Etidium Bromida. Selanjutnya dilakukan persiapan sampel dengan cara campurkan 8 μ l hasil PCR dengan 2 μ l *blue juice loading dye*, lalu muat ke sumur gel. Proses terakhir elektroforesis gel yaitu dilakukan running dengan cara jalankan elektroforesis pada 100 A selama 60 menit. Band DNA dibandingkan dengan kontrol positif.

2.7.2.5. Dokumentasi Gel (Gel Doc)

Meliputi pengaturan alat, posisi gel, pengambilan gambar menggunakan software Quantity One, serta penyimpanan dan pencetakan gambar hasil elektroforesis.

2.7.3.6. Identifikasi Spesimen Gen *Carbapenemase*

DNA diekstraksi menggunakan kit gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan), sesuai dengan protokol yang disediakan oleh pabrik. Singkatnya, suspensi bakteri disiapkan dengan kekeruhan setara dengan standar McFarland 0,5–1,0. Sel kemudian dilisis, dan DNA diikat ke kolom filter khusus, dicuci untuk menghilangkan kontaminan, dan akhirnya diekstraksi dengan buffer yang dipanaskan untuk mengumpulkan DNA yang telah dimurnikan. Untuk mendeteksi gen karbapenemase, PCR konvensional dilakukan menggunakan GoTaq® Green Master Mix (Promega, AS) dan primer spesifik yang menargetkan lima gen resistensi utama: blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, dan blaOXA-48. Selain itu, PCR digunakan untuk menentukan spesies bakteri Gram-negatif dengan menggunakan penanda gen: UidA untuk *Escherichia coli*, 16S rDNA untuk *Enterobacter* spp., GyrA untuk *Klebsiella* spp., RpoB untuk *Klebsiella pneumoniae*, dan PA-SS untuk *Pseudomonas aeruginosa*. Proses PCR dimulai dengan memanaskan sampel hingga 94°C selama 10 menit untuk memisahkan untai DNA (denaturasi awal), diikuti oleh 30 siklus amplifikasi. Setiap siklus meliputi: 20 detik pada 94°C (denaturasi), 40 detik pada 52°C (ikatan primer), dan 30 detik pada 72°C (ekstensi DNA). Langkah ekstensi akhir dilakukan pada 72°C selama 5 menit untuk menyelesaikan sintesis DNA. Fragmen DNA yang diamplifikasi (produk PCR) kemudian dimuat ke dalam gel agarosa 1,5% dan diwarnai dengan etidium bromida untuk memvisualisasikan band DNA. Elektroforesis dilakukan dalam buffer TBE 0,5 $\times$, dan band-band tersebut diamati menggunakan sistem dokumentasi gel (Bio-Rad® Gel Doc™). Ukuran setiap fragmen DNA ditentukan dengan membandingkannya dengan tangga DNA standar 100 bp.

2.8 Definisi Operasional

2.8.1 Swab Wastafel

Swab wastafel pada penelitian ini adalah swab Amies dimasukkan ke dalam saluran pembuangan (inlet) wastafel sedalam 5-10 cm, kemudian diputar pada sisi dinding pipa wastafel, minimal 3 kali hingga setengah dari lingkaran pipa pembuangan telah diambil sampelnya. Swab wastafel diambil di ruang IGD, tindakan di Puskesmas di Kota Makassar. Transpor ke laboratorium Mikrobiologi klinik menggunakan kotak spesimen dengan *icepack* dalam waktu paling lambat < 8 jam setelah pengambilan sampel.

2.8.2 Gen Penyandi *Carbapenemase*

Gen penyandi *carbapenemase* pada penelitian ini adalah gen Kelas A (blaKPC), gen Kelas B (gen penyandi *Metallo- β -lactamase*: blaNDM, blaVIM, blaIMP) atau gen Kelas D (gen penyandi *oxacillinase* ; blaOXA48) dengan pemeriksaan *polymerase chain reaction* menggunakan primer. Identifikasi terhadap gen-gen tersebut dilakukan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan primer spesifik yang masing-masing menghasilkan ukuran produk amplifikasi (amplicon) tertentu. Berikut adalah urutan primer yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Gen *blaKPC* dengan Primer maju (KPC-Fm): CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG. Primer balik (KPC-Rm): CTTGTCATCCTTGTTAGGCG dan ukuran amplicon: 798 bp. Sedangkan untuk Gen

blaNDM menggunakan Primer maju (NDM-F): GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC. Primer balik (NDM-R): CGGAATGGCTCATCACGATC. Ukuran amplicon: 621 bp. Untuk Gen *blaIMP* dengan primer maju (IMP-F): GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC. Primer balik (IMP-R): GGTTTAAYAAAACAACCACC. Ukuran amplicon: 232 bp. Gen *blaVIM* Primer maju (VIM-F): GATGGTGTGGTTCGCATA. Primer balik (VIM-R): CGAATGCGCAGCACCAG. Ukuran amplicon: 390 bp. Untuk Gen *blaOXA-48* menggunakan Primer maju (OXA-F): GCGTGGTTAAGGATGAACAC. Primer balik (OXA-R): CATCAAGTTCAACCCAACCG. Ukuran amplicon: 438 bp.

Seluruh proses PCR dilakukan dengan protokol standar yang mencakup tahap pra-denaturasi, denaturasi, penempelan primer (annealing), ekstensi, dan ekstensi akhir, disesuaikan dengan suhu dan waktu masing-masing siklus. Hasil amplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose dan didokumentasikan untuk menilai keberadaan pita DNA spesifik.

Kriteria obyektif gen penyandi *carbapenemase*:

2.8.2.1 Ditemukan gen penyandi carbapenemase:

Bila pada pemeriksaan PCR ditemukan gen *blaKPC* dinyatakan gen KPC positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 798 bp, Dinyatakan gen *blaNDM* positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 621 bp, Dinyatakan gen *blaVIM* positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 390 bp, Dinyatakan gen *blaIMP* positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 232 bp, Dinyatakan gen *blaOXA 48* positif bila pita DNA hasil amplifikasi PCR yang nampak pada elektroforesis diperkirakan 438 bp.

2.8.2.2 Tidak ditemukan gen penyandi carbapenemase:

Bila pada pemeriksaan PCR tidak ditemukan satupun dari gen *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP* dan *blaOXA48*.

2.8.3 Bakteri Negatif Gram

Bakteri Negatif Gram pada penelitian ini yaitu *Enterobacteriaceae species* yaitu *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Enterobacter sp.*, serta *Pseudomonas aeruginosa* yang teridentifikasi dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dari swab wastafel di ruang IGD, ruang perawatan gigi terutama di Puskesmas seluruh wilayah Kota Makassar.

Kriteria obyektif Bakteri Negatif Gram :

Untuk *Escherichia coli*, digunakan primer yang menargetkan gen *UidA*, menghasilkan produk PCR berukuran 530 bp. Pada elektroforesis gel agarosa, pita DNA yang jelas tampak menunjukkan keberhasilan amplifikasi spesifik.

Untuk *Enterobacter sp.*, digunakan primer universal 16S rDNA dengan produk 372 bp. Target ini dipilih karena sifat konservatifnya yang memungkinkan identifikasi genus *Enterobacter* secara sensitif.

Untuk *Klebsiella sp.*, amplifikasi dilakukan terhadap gen *GyrA*, menghasilkan produk 441 bp. Gen ini dipilih karena berperan penting dalam replikasi DNA dan sering digunakan untuk membedakan *Klebsiella* dari *Enterobacteriaceae* lain.

Sedangkan untuk *Klebsiella pneumoniae* spesifik, digunakan target *RpoB* dengan produk 108 bp. Ukuran amplicon yang relatif kecil memudahkan deteksi cepat dan mengurangi risiko kegagalan PCR akibat fragmentasi DNA.

Pada *Pseudomonas aeruginosa*, digunakan primer PA-SS yang menghasilkan produk amplifikasi 956 bp. Pita tunggal yang muncul pada elektroforesis memperkuat spesifisitas

primer ini terhadap *P. aeruginosa*.

Hasil analisis karakteristik primer menunjukkan bahwa semua pasangan primer memiliki panjang 18–24 nukleotida dengan komposisi GC yang seimbang (40–60%). Perhitungan suhu leleh (T_m) menggunakan rumus Wallace menunjukkan nilai antara 54–70 °C, sehingga suhu annealing awal yang direkomendasikan berkisar antara 50–67 °C tergantung pasangan primer. Waktu ekstensi dihitung berdasarkan ukuran produk PCR, dengan aturan umum 1 kb per menit pada 72 °C, sehingga berkisar antara 15 detik untuk fragmen kecil (108 bp) hingga 60 detik untuk fragmen besar (956 bp).

Secara keseluruhan, hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang sesuai dengan ukuran produk PCR yang diharapkan pada setiap bakteri. Hal ini menegaskan bahwa desain primer yang digunakan dalam penelitian ini valid dan dapat dijadikan dasar untuk identifikasi molekuler bakteri patogen pada sampel lingkungan maupun klinis.

2.9 Pengumpulan Data

Sampel wastafel dikumpulkan dari semua puskesmas di kota Makassar dari bulan September 2024 hingga Desember 2024. Staf yang memiliki pengetahuan tentang indikator data karakteristik di puskesmas diwawancarai dari setiap fasilitas. Selain itu, foto-foto diambil dari wastafel yang menjadi sampel.

2.10 Pengambilan Sampel Wastafel

47 sampel puskesmas dalam penelitian ini memiliki wastafel diambil sampelnya dari semua fasilitas yang memiliki setidaknya satu wastafel di ruang gawat darurat atau wastafel di ruang tindakan gigi. Flocked Eswab (COPAN Diagnostics, Murrieta, CA) digunakan untuk mengumpulkan sampel dari saluran pembuangan wastafel. Usap dimasukkan (hingga garis putus-putus merah pada usap) ke dalam saluran pembuangan dan kemudian diputar pada sisi dinding pipa wastafel beberapa kali hingga setengah dari keliling pipa pembuangan telah diambil sampelnya. Sampel yang terkumpul diawetkan dalam tabung dengan media Amies dan diangkat di atas es ke laboratorium untuk kultur dan pemeriksaan molekuler

2.11 Analisis Data

Analisis deskriptif digunakan untuk mengkarakterisasi karakteristik wastafel di rumah sakit dalam penelitian ini. Analisis statistik menggunakan microsoft excel.

2.12 Aspek Etika Penelitian

Tidak akan terjadi masalah etis pada penelitian ini karena:

1. Semua rujukan yang digunakan pada naskah ini diberi sitasi penulis atau editor dari jurnal atau buku yang dirujuk.
2. Penelitian ini mendapat izin dari Kepala Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu Provinsi Sulawesi Selatan
3. Penelitian ini mendapat izin dari semua kepala puskesmas yang bersangkutan.